

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235794**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423995**

(22) Data zgłoszenia: **21.12.2017**

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

(54) **Sposób wykrywania pozostałości celulozy w półprzepuszczalnych membranach szerokoporowatych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

01.07.2019 BUP 14/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

19.10.2020 WUP 16/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII
BIOMEDYCZNEJ IM. MACIEJA NAŁĘCZA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ CHWOJNOWSKI, Warszawa, PL
EWA ŁUKOWSKA, Warszawa, PL
CEZARY WOJCIECHOWSKI, Sulejówek, PL
MONIKA WASYŁECZKO, Warszawa, PL
WIOLETA SIKORSKA, Warszawa, PL
ZUZANNA KRYSIAK, Zielonka, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Grażyna Padée

PL 235794 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania pozostałości celulozy w półprzepuszczalnych poliarylosulfonowych membranach szerokoporowatych.

Polisulfony (PSf) oraz polieterosulfony (PES) są elastycznymi, wytrzymałymi, odpornymi na wysokie temperatury oraz odpornymi chemicznie materiałami wykorzystywanymi do produkcji półprzepuszczalnych membran płaskich, kapilarnych, mikrokapsulek. Znalazły one szerokie zastosowanie w przemyśle, np. w formie membran do odwróconej osmozy używanych do odsalania wody. Poliarylosulfony (polisulfony, jak i polieterosulfony) można otrzymywać w postaci biogodnej, dlatego znalazły również szerokie zastosowanie w medycynie, np. w hemodializatorach. Polisulfonowe i polieterosulfonowe membrany płaskie, 3D oraz szerokoporowate znalazły zastosowanie w hodowlach komórkowych. [D. Stamatialis, B.J. Papenburg et al. – Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering 2008, Muhammad Irfan, Ani Idris. Overview of PES biocompatible/hemodialysis membranes: PES–blood interactions and modification techniques. Materials Science and Engineering C 2015].

Membrany szerokoporowate, przeznaczone do hodowli komórek, takich jak chondrocyty czy hepatocyty, otrzymuje się metodą inwersji faz, z dodatkiem odpowiednich prekursorów porów. Takim prekursorem jest poliwinylpirolidon (PVP), który dodaje się w celu uzyskania mikroporów (uzyskanie półprzepuszczalnej struktury membrany), natomiast w celu uzyskania makroporów dobrze ze sobą skomunikowanych bardzo dobrym poroforem okazała się bibuła celulozowa z bawełny lub włóknina celulozowa z celulozy regenerowanej, o grubości włókien zbliżonych do włókien bawełny [Dudziński K., Chwojnowski A., Gutowska M., Płończak M., Czubak J., Łukowska E., Wojciechowski C. – Three dimensional polyethersulphone scaffold for chondrocytes cultivation – the future supportive material for articular cartilage regeneration; Biocybernetics and Biomedical Engineering 30(3)(2010)65–76; Patent PL 211793; Patent PL 223271].

Prekursory porów muszą być usunięte z gotowej membrany. Poliwinylpirolidon, materiał przyjazny dla środowiska i organizmu, może być łatwo usunięty z membrany za pomocą wody, natomiast eliminacja celulozy z wnętrza membrany okazała się niezwykle trudna. Tymczasem pozostawienie nawet niewielkiej ilości celulozy w materiale skafoldu powoduje nie tylko zmianę budowy implantu (znieskształcone i niedrożne pory), ale może skutkować zbyt dużą odpowiedzią immunologiczną, dlatego tak ważne jest całkowite jej usunięcie. W konsekwencji ważna jest także możliwość wiarygodnego sprawdzenia, czy celuloza została usunięta z membrany.

Celulozę rozpuszcza się kompleksem tetraaminomiedzi (odczynnik Schweizera), który to proces prowadzi się przez 4 tygodnie. Otrzymaną membranę poddaje się kontroli stopnia wytrawienia celulozy poprzez obserwację wnętrza z zastosowaniem mikroskopii elektronowej SEM. Metoda ta nie jest całkowicie pewna, ponieważ nie obejmuje całości, a jedynie fragmenty pobranych z membrany preparatów, które nie są inherentne dla całej membrany. Procedura ta jest również bardzo pracochłonna, ponieważ wymaga wykonania wielu powiększeń z różnych fragmentów preparatu.

Inną metodą jest enzymatyczne trawienie celulozy za pomocą celulazy, które również nie jest wystarczająco dokładne. Metoda oparta jest na oznaczaniu glikozy powstającej w wyniku hydrolizy celulozy. Celulaza, nie dająca się usunąć z matrycy analitycznej, reaguje w tej samej reakcji powodując błędy dodatnie. Z kolei hydroliza kwasami mineralnymi jest zarówno zawodna, jak i czasochłonna. I wreszcie, analiza elementarna pozwalająca określić masę celulozy w analizowanej próbce (nie zawiera siarki) przez odjęcie masy polimeru zawierającego siarkę (PS, PES) jest obciążona zbyt dużym błędem, aby mogła być użyta do kontroli stopnia usunięcia celulozy z membrany.

Celem wynalazku było opracowanie metody analitycznej pozwalającej na skuteczne, wiarygodne i szybkie wykrycie ewentualnych pozostałości celulozy w strukturze membrany poliarylosulfonowej.

Sposób wykrywania pozostałości celulozy w półprzepuszczalnych poliarylosulfonowych membranach szerokoporowatych według wynalazku charakteryzuje się tym, że ze środka geometrycznego membrany pobiera się próbkę, suszy się ją w temperaturze od 20°C do 110°C i rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym nierozpuszczającym celulozy, a rozpuszczającym poliarylosulfony albo w mieszaninie takich rozpuszczalników, w temperaturze od 20°C do 120°C, następnie usuwa się roztwór z osadu, przemywa się rozpuszczalnikiem z grupy zdefiniowanej powyżej, korzystnie od 1 do 5 razy, po czym usuwa się roztwór płuczący, pozostałość suszy się w temperaturze od 40°C do 120°C i wykonuje się mikroobrazy w celu zidentyfikowania obecności struktur włóknistych. Jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się: N-metylo-2-pirolidon, N,N-dimetyloacetamid, N,N-dimetyloformamid, dimetylo-sulfotlenek lub ich mieszaniny w dowolnych stosunkach.

Próbka pobrana ze środka membrany ma korzystnie powierzchnię 0,5–1,0 cm².

Korzystnie roztwór płuczący usuwa się przez odparowanie lub odwirowanie.

Korzystnie mikroobrazy wykonuje się wykorzystując mikroskop elektronowy.

Korzystnie przed wykonaniem mikroobrazów próbkę napyła się warstwą przewodnika o grubości 5–10 nm.

Brak struktur włóknistych w obrazie mikroskopowym potwierdza usunięcie celulozy z membrany, czyli jej całkowite wytrawienie podczas produkcji.

W sposobie według wynalazku, zamiast dążyć do usunięcia z membrany pozostałości celulozy, usuwa się materiał membranotwórczy, a pozostałą celulozę oznacza. Fragment do analizy pobiera się ze środka membrany, ponieważ jest to miejsce, z którego najtrudniej usunąć celulozę. Wielokrotne próby wykazały, że jeżeli próbka pobrana ze środka geometrycznego membrany nie zawiera włókien celulozowych, to nie występują one również w pozostałych fragmentach membrany.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 – Pozostałości niestrawionych włókien celulozy, po rozpuszczeniu i osuszeniu fragmentu polieterosulfonowej membrany pobranego ze środka membrany. Analiza została wykonana za pomocą mikroskopu optycznego z 4× powiększeniem.

Fig. 2 – Pozostałości włókien niestrawionej celulozy, po rozpuszczeniu oraz osuszeniu fragmentu polieterosulfonowej membrany pobranego ze środka membrany. Analiza została wykonana za pomocą mikroskopu optycznego z 4× powiększeniem.

Fig. 3 – Przełom szerokoporowatej membrany polieterosulfonowej z widocznymi włóknami niestrawionej celulozy. Fragment został pobrany ze środka membrany, osuszony, przełamany w ciekłym azocie oraz napyłony warstwą złota o grubości 5–10 nm. Obraz został wykonany za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem ×300.

Fig. 4 – Przełom szerokoporowatej membrany polieterosulfonowej z siecią wzajemnie połączonych porów po całkowitym usunięciu włókien celulozy. Fragment został pobrany ze środka membrany, osuszony, przełamany w ciekłym azocie oraz napyłony warstwą złota o grubości 5–10 nm. Obraz został wykonany za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem ×300.

Fig. 5 – Fragment pobrany ze środka membrany, przedstawiający niestrawione włókna celulozy po niedokładnym rozpuszczeniu polieterosulfonu. Przedstawione sfery/aglomeraty reprezentują niewypłukany i ponownie wytrącony polimer. Obraz został wykonany za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem ×1,0 k.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1

Próbkę o powierzchni 1 cm² pobieraną ze środka arkusza membrany poliarylosulfonowej suszono przez 30 minut w temperaturze 105 ±2°C. Wysuszoną próbkę umieszczono w szklanej probówce wirowkowej, o pojemności 10 ml i dodano 6 ml N-metylo-2-pirolidonu (NMP). Zawartość probówki pozostawiono na 45 min w temperaturze 60°C i następnie mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex przez 10 min. Następnie zawartość probówki wirowano przy 1500 rpm przez 10 min i ostrożnie odciągano pipetą 5 ml supernatantu znad osadu. Ponownie do probówki dodawano 5 ml rozpuszczalnika. Powyższą procedurę powtarzano dwukrotnie, z tym że na końcu odbierano 5,5 ml supernatantu. Pozostałość (około 0,5 ml) przeniesiono na małe szkiełko zegarkowe i odparowywano rozpuszczalnik w temp. 60°C. Po odparowaniu całego rozpuszczalnika podniesiono temperaturę do 105°C i dosuszono próbkę przez 30 min. Tak przygotowaną próbkę oglądano za pomocą mikroskopu optycznego, w powiększeniu co najmniej 200× i kolejno za pomocą mikroskopu SEM, w powiększeniu 1000–5000×.

Przykład 2

Procedurę rozpuszczania membrany wykonanej z polieterosulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając zamiast N-metylo-2-pirolidonu mieszaniny rozpuszczalników składającej się z N,N-dimetyloformamidu i N-metylo-2-pirolidonu (1/1 v/v). Temperatura rozpuszczania w mieszaninie rozpuszczalników wynosiła 50°C. Przed wykonaniem mikroobrazów próbkę napyłono cienką (7–10 nm) warstwą przewodnika (złota).

Przykład 3

Procedurę rozpuszczania membrany wykonanej z polieterosulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając N,N-dimetyloacetamidu zamiast N-metylo-2-pirolidonu. Temperatura rozpuszczania w mieszaninie rozpuszczalników wynosiła 90°C. Przed wykonaniem mikroobrazów próbkę napyłono cienką (7–10 nm) warstwą przewodnika (złota).

Przykład 4

Procedurę rozpuszczania membrany wykonanej z polisulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając N-metylo-2-pirolidonu. Temperatura rozpuszczania w mieszaninie rozpuszczalników wynosiła 110°C. Przed wykonaniem mikroobrazów próbkę napyłono cienką (7–10 nm) warstwą przewodnika (Pt–Pd).

Przykład 5

Procedurę rozpuszczania membrany wykonanej z polisulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając N,N-dimetyloacetamidu zamiast N-metylo-2-pirolidonu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wykrywania pozostałości celulozy w półprzepuszczalnych poliarylosulfonowych membranach szerokoporowatych, **znamienny tym**, że ze środka geometrycznego membrany pobiera się próbkę, suszy się ją w temperaturze od 20°C do 110°C i rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym wybranym spośród N-metylo-2-pirolidonu, N,N-dimetyloacetamidu, N,N-dimetyloformamidu, dimetylosulfotlenku lub ich mieszaniny w dowolnych stosunkach, w temperaturze od 20°C do 120°C, następnie usuwa się roztwór z nad osadu, osad przemywa się rozpuszczalnikiem z grupy zdefiniowanej powyżej, po czym usuwa się roztwór płuczący, pozostałość suszy się w temperaturze od 40°C do 120°C i wykonuje się mikroobrazy w celu zidentyfikowania obecności struktur włóknistych.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pobiera się próbkę o powierzchni 0,5–1,0 cm².
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że płukanie wykonuje się od 1 do 5 razy.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór płuczący usuwa się przez odparowanie lub odwirowanie.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mikroobrazy wykonuje się wykorzystując mikroskop elektronowy.
6. Sposób według zastrz. 1 albo 5, **znamienny tym**, że przed wykonaniem mikroobrazów próbkę napyła się warstwą przewodnika, o grubości 5–10 nm.

Rysunki

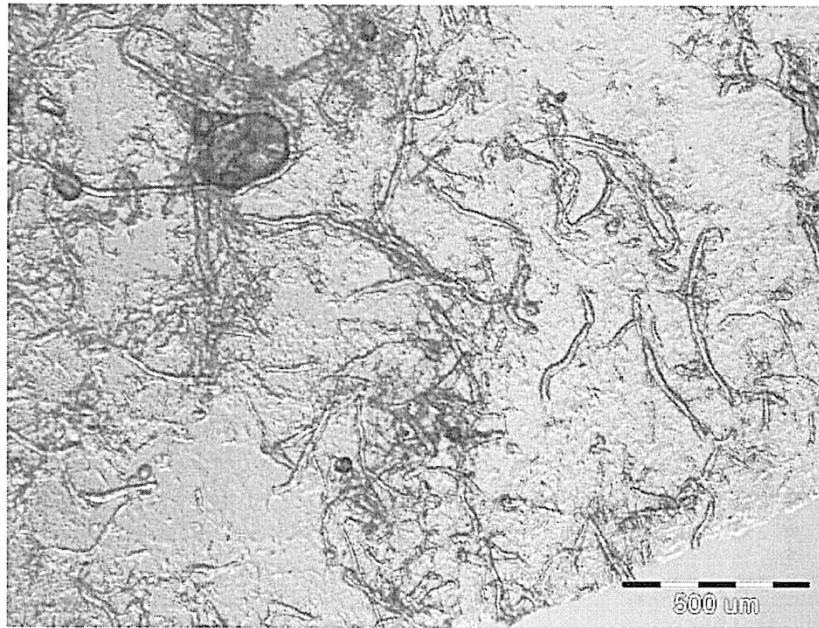


Fig. 1

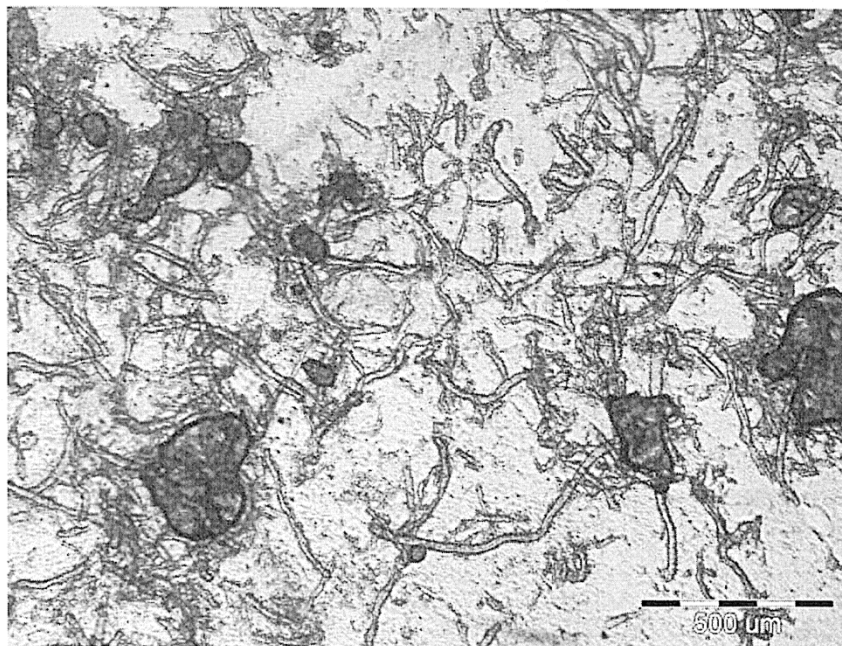
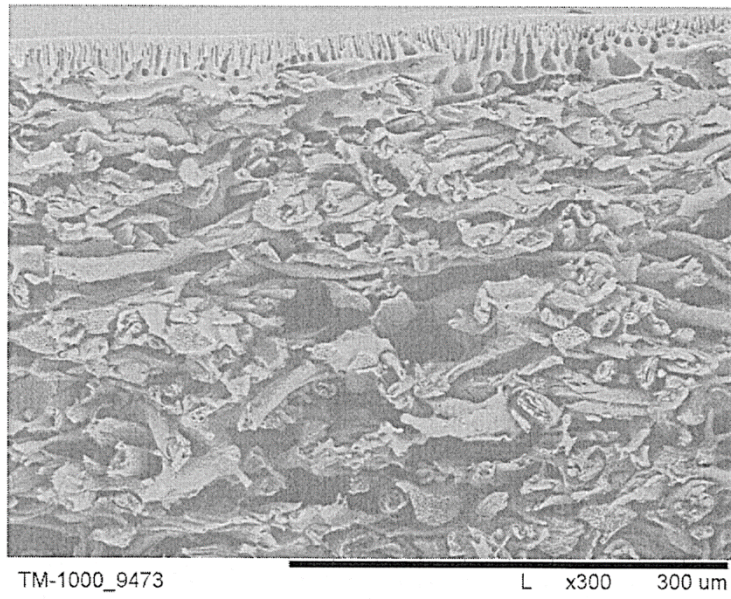
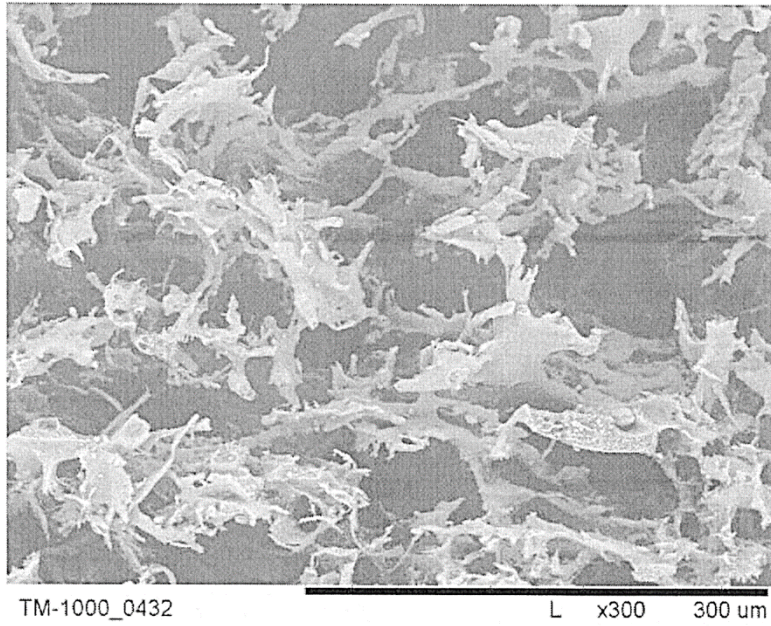


Fig. 2

**Fig. 3****Fig. 4**

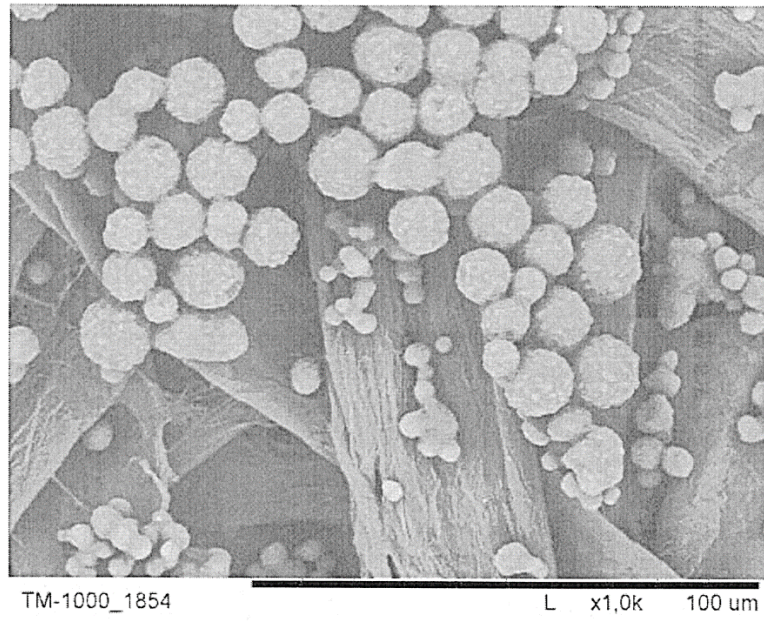


Fig. 5